

文章编号:1673-5501(2008)01-0053-10

多柔比星心肌病发病机制研究现状

苏钰雯 综述 杜军保 审校

多柔比星(doxorubicin)属蒽环类抗肿瘤药物,自1967年发现以来,已广泛用于临床治疗肿瘤性疾病^[1-2],目前主要用于治疗白血病、淋巴瘤、肺癌及胃癌等多种恶性肿瘤,是最常用的抗肿瘤药物之一,但其不良反应除骨髓抑制、胃肠道反应、口腔炎、脱发及静脉炎等外,长期应用还可发生剂量依赖性心脏毒性作用。1970年,Bonadonna等^[3]首次报道了多柔比星在抗肿瘤中引发心脏病变,主要为ECG的异常,包括心动过速,S-T段下移,T波改变。此后陆续有报道在应用多柔比星治疗过程中出现心肌病、心力衰竭甚至导致患者死亡^[4-8]的病例。多年来大量的研究证实,多柔比星可引起类似扩张型心肌病样病理生理改变,以及在此基础上发生的充血性心力衰竭,且这种改变具有剂量依赖性^[6],从而使其临床应用受到限制。目前,多柔比星心肌病的发病机制仍未完全阐明,研究其发病机制至今仍是令人关注的热门研究课题之一,且对于指导其临床应用具有重要意义。现将多柔比星心肌病的发病机制研究现状综述如下。

1 氧化应激作用及自由基的形成

许多研究表明多柔比星心肌病与体内产生大量的自由基有密切关系。研究发现,多柔比星与心肌组织的亲和力明显高于其他组织,使得心肌组织更易受到多柔比星的损害,从而导致多柔比星在心肌细胞中积聚^[9]。大量的体内、外研究证实,给予多柔比星后,心肌细胞内过氧化氢(H_2O_2)浓度显著提高。与机体其他组织器官(如肝、肾等)相比,心脏的抗氧化防御能力相对较弱^[10]。因此,心脏对活性氧(reactive oxygen species, ROS)的损伤更为敏感^[11],ROS包括超氧阴离子(O_2^-)、 H_2O_2 和羟自由基($\cdot OH$)等^[12,13]。Wallace^[14]指出多柔比星在机体内易产生自由基和细胞损伤氧化反应,从而导致心肌结构的各种改变。多柔比星进入心肌细胞后,在肌浆网中由还原型辅酶II(NADPH)及细胞色素P450还原酶、线粒体中的还原型辅酶I(NADH)及NADH脱氢酶、胞液中的黄嘌呤氧化酶等作用下形成多柔比星半醌自由基^[15],多柔比星半醌自由基与多柔比星醌环之间形成循环,不停地传递电子给 O_2 生

成 O_2^- ,这是多柔比星致心肌细胞产生 O_2^- 的主要途径。另一个途径是一个非酶过程,这个过程涉及到多柔比星-铁复合物的形成,即多柔比星醌环- Fe^{3+} 络合物与多柔比星醌环- Fe^{2+} 络合物之间形成循环,不断地传递单电子给 O_2 生成 O_2^- , O_2^- 经歧化反应生成 H_2O_2 增加, O_2^- 与 H_2O_2 通过Haberweiss反应或Fenton反应产生大量的 $\cdot OH$ ^[16]。

多柔比星诱导心肌细胞产生诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide, iNOS),使心肌细胞产生NO增加,NO与 O_2^- 反应生成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)^[17]。 $ONOO^-$ 属活性氮(reactive nitrogen species, RNS),是一种强氧化剂。在生理状态下,细胞中存在着完整的抗氧化酶系统,如谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxidized dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)及过氧化物酶(peroxidase, POD),他们通过各自的反应清除 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 ,如:具有正常活性的SOD及时清除 O_2^- ,故不生成 $ONOO^-$ ^[18];具有正常活性的GSH-Px及时清除 H_2O_2 ,故不存在 H_2O_2 及 $\cdot OH$ 的蓄积^[12],使心肌细胞处于氧化与抗氧化平衡状态。而多柔比星可在转录水平抑制SOD和GSH-Px的mRNA表达^[19],导致心肌细胞的SOD和GSH-Px活性降低,使心肌细胞清除 O_2^- 和 H_2O_2 功能障碍,致心肌细胞产生ROS增加,使心肌细胞氧化与抗氧化失衡而处于氧化应激状态,由ROS及 $ONOO^-$ 作用于心肌细胞膜及各种细胞器膜上的磷脂中的多价不饱和脂肪酸,形成脂质自由基,引发脂质过氧化反应,使膜的结构发生改变、扭曲,并氧化膜蛋白质使其结构及功能异常,最终导致膜的完整性遭到破坏,膜的流动性降低,通透性增加,容量调节功能及离子转运功能障碍^[20]而导致心肌细胞氧化损伤^[12,13,21]。

在心肌细胞中,最主要的抗氧自由基(oxygen free radical, OFR)的酶是硒依赖性GSH-Px^[22],多柔比星能使心肌细胞的GSH-Px活性降低,使GSH的利用受到抑制而不能有效地保护心肌细胞免受OFR的损伤^[23]。而且研究发现,早期、持续的GSH-Px及其蛋白的降低,会在多柔比星心肌病和心力衰竭的发生中起很重要的作用^[24]。GSH-Px活性降低的原因可能是由于多柔比星降低心肌细胞内

砸含量的缘故;也有学者认为多柔比星引发的脂质过氧化反应增强,损伤 GSH-Px 的巯基基团的结果。多柔比星使心肌细胞主要的抗 OFR 酶的活性降低,使心肌细胞极易受其所产生的 OFR 的损伤。

Chen 等^[25]对多柔比星心肌病小鼠研究发现,发生氧化应激后,心肌细胞中烯醇化酶的活性降低 25%,而烯醇化酶正是心肌细胞糖酵解的限速酶,因此,他们认为,发生氧化应激后,由于细胞生物能量代谢的异常导致心肌病的发生。

Munoz-Castaneda 等^[26]研究认为,切除卵巢后,多柔比星引起的氧化应激损伤会更加严重,说明卵巢分泌的激素对多柔比星引起的氧化应激有重要影响。发生氧化应激的结果最终导致细胞凋亡的发生。Lou 等^[27]研究发现多柔比星诱发的氧化应激,可以活化有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK),从而激活凋亡前蛋白 Bax,启动凋亡程序。

2 铁代谢失衡

研究发现,多柔比星能导致铁在肿瘤细胞和分化的心肌细胞铁蛋白中的显著积聚,这可能是多柔比星的细胞毒性机制之一^[28]。进一步的研究发现,多柔比星通过抑制铁从铁蛋白中解离,从而导致铁在分子水平的大量聚集,引起心肌损伤^[29],这一点通过铁脉冲示踪技术得到了验证^[22]。而铁蛋白的分解代谢是由溶酶体来完成的。多柔比星处理后导致溶酶体损伤可能是多柔比星导致铁离子在铁蛋白中积聚的原因。研究发现抑制溶酶体活性或蛋白酶活性也可使铁离子在铁蛋白中积聚显著增加,故溶酶体/蛋白酶可能是多柔比星的新靶向^[30]。铁调节蛋白 (iron regulatory protein, IRP) 是胞质中一类可与铁转运和储存蛋白质 mRNA 中的铁反应元件 (iron responsive elements, IRE) 结合的蛋白质,有 IRP-1 和 IRP-2 两种形式,主要对参与编码铁静态和利用的蛋白质 mRNA 的表达和翻译进行调控。Minotti 等^[31]在鼠脑胚胎心肌 H9C2 细胞中发现,多柔比星的代谢产物 doxorubicinol 在 ROS 的协同作用下灭活 IRP-1;且也能导致 IRP-2 灭活,在灭活 IRP-2 的过程中,仅 ROS 发挥作用。总之,多柔比星可作用于铁代谢的多个环节,引起铁代谢失衡,从而引起自由基增加、钙超载和线粒体病,进一步加重机体损伤。

3 钙超载

各种原因引起的细胞内钙含量异常增多,并导致细胞结构损伤和功能代谢障碍的现象,称为钙超载。而心肌细胞调节 Ca^{2+} 功能障碍,致胞质中游离 Ca^{2+} 浓度增高即为心肌细胞钙超载。肌浆网是贮存、释放兴奋-收缩耦联介质 Ca^{2+} 的场所,也是心肌细胞内调节 Ca^{2+} 的重要细胞器,其通过膜上 Ca^{2+} 通道释放 Ca^{2+} 参与心肌的收缩;由膜上

Ca^{2+} -ATPase 主动摄取 Ca^{2+} 参与心肌的舒张,以此维持细胞内 Ca^{2+} 的稳态。 Ca^{2+} 在维持心肌细胞兴奋-收缩耦联中起重要作用。心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度变化可作为心脏对外源性化合物侵袭的敏感信号。外源性化合物刺激引起心肌细胞应激,可致胞内游离 Ca^{2+} 浓度明显升高,引起钙稳态紊乱,最终导致细胞的坏死或凋亡。正常情况下,胞内 Ca^{2+} 浓度显著低于胞外 Ca^{2+} 浓度,胞内 Ca^{2+} 主要储存于线粒体和肌浆网^[11]。Kim 等^[32]发现多柔比星激活肌浆网膜上的 Ca^{2+} 通道,使 Ca^{2+} 释放增加。多柔比星能破坏心肌细胞膜结构的完整性,影响膜的渗透性,使膜磷脂镶嵌蛋白解聚,形成新的钙通道,诱发胞外 Ca^{2+} 内流;多柔比星抑制 Na^{+} - K^{+} -ATPase 的活性,使 Na^{+} - K^{+} 交换减少, Na^{+} - Ca^{2+} 交换增加而加速 Ca^{2+} 内流,从而诱发钙超载;同时多柔比星还能刺激线粒体和肌浆网,将 Ca^{2+} 释放至胞质,加重 Ca^{2+} 超载^[33]。胞内 Ca^{2+} 浓度持续升高后, Ca^{2+} 作为第二信使迅速激活多条 Ca^{2+} 依赖的细胞损伤途径,从而进一步加重心肌的损伤。Ondrias 等^[34]发现,在开始阶段多柔比星激活 Ca^{2+} 通道,约 8 min 后 Ca^{2+} 通道呈不可抑制性灭活,从而说明多柔比星早期快速增加细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,使心电活动发生改变,导致各种心律失常;后期则由其产生的 OFR 损伤心肌,逐步发展为充血性心力衰竭。

Jaenke^[35]发现多柔比星使心肌中 Ca^{2+} 浓度升高,与心肌形态学改变有良好相关性,且早于心肌形态学上的改变,提示 Ca^{2+} 浓度升高参与了心肌的损伤。Maeda 等^[36]发现多柔比星致心肌细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性增加,促进细胞外 Ca^{2+} 内流,最终导致细胞内 Ca^{2+} 超载。Huang 等^[37]发现,多柔比星抑制心肌细胞肌浆网膜上的 Ca^{2+} -ATPase 基因表达,影响 Ca^{2+} -ATPase 的生物合成致其活性降低,使肌浆网摄 Ca^{2+} 功能障碍;并发现给治疗剂量的多柔比星对实验兔注射后可使心室肌肥厚,心功能下降,心肌细胞内钙超载及 Ca^{2+} -ATPase 活性降低^[38]。心肌细胞内钙超载是多柔比星心功能损伤的重要病理生理机制。Santos 等^[39]发现多柔比星致心肌细胞 Ca^{2+} 超载可促进 ROS 引发心肌细胞脂质过氧化,加重心肌细胞损伤,可致心肌细胞线粒体内 Ca^{2+} 增加,从而抑制线粒体呼吸链的 NADH 脱氢酶,使线粒体氧化呼吸链电子传递链障碍,致线粒体产生 ATP 功能障碍,加重心肌细胞损伤,甚至导致细胞死亡。

4 硝基化作用

ONOO^{-} 与蛋白质分子中酪氨酸结构上的硝基反应生成硝基酪氨酸,即为酪氨酸硝基化,酪氨酸硝基化可导致蛋白质结构及功能异常^[40]。 ONOO^{-} 是由 O_2^{-} 与 NO 反应生成^[17]。正常心肌细胞中存在生理浓度的 NO 及心肌细胞需氧代谢产生的少量 O_2^{-} ,但心肌细胞同时存在具有正常活性的 SOD 及时清除 O_2^{-} ,故不生成 ONOO^{-} ;多柔比星可致心肌细胞的 SOD 活性降低,使心肌细胞清除 O_2^{-} 功能障碍,

致 ONOO^- 产生增加。阳冠明等^[41]发现 1,6-二磷酸果糖(fructose-1,6-diphosphate, FDP)可抑制多柔比星引起心肌 iNOS mRNA 表达,使心肌产生 NO 减少,并保护心肌 SOD 活性使心肌清除 O_2^- 的能力增强,从而减少心肌组织中 ONOO^- 的生成,据此进一步提出 FDP 可通过抑制多柔比星导致的心肌酪氨酸硝基化而减轻多柔比星对心肌的毒性损伤。Weinstein 等^[17]用免疫组化法检测多柔比星所致心肌损伤小鼠心肌组织中的硝基酪氨酸,发现 ONOO^- 对心肌细胞酪氨酸硝基化具有选择性,且心肌细胞酪氨酸硝基化程度与心功能失调密切相关。Pacher 等^[42]用金属卟啉类的降解剂 FPI5 干预多柔比星所致小鼠心肌毒性损伤,发现 FPI5 抑制 ONOO^- 引发的心肌细胞酪氨酸硝基化而改善心功能,证实 ONOO^- 引发的心肌细胞酪氨酸硝基化是导致多柔比星心肌病发生的重要机制之一。

5 线粒体损伤与能量代谢障碍

线粒体是细胞能量代谢的重要场所,许多细胞发生损伤时,都会引起线粒体的改变,心肌是代谢活跃的组织,因此,心肌细胞内线粒体的变化更令人关注。线粒体在心肌细胞的能量代谢中起重要作用,其摄取 Ca^{2+} 的速度很慢,但存储量很大,是调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的主要细胞器之一。心肌细胞线粒体损伤是多柔比星心脏毒性发生的早期重要标志。Green 等^[43]研究发现,较低剂量的多柔比星能迅速引起线粒体膜电位的减弱,给药 6 h 后心肌细胞发生凋亡,提示线粒体功能紊乱是心肌细胞凋亡的早期预兆。大量证据表明,在多柔比星引起的心肌病发病过程中,线粒体是主要的靶向器官^[44]。

多柔比星心肌病发生过程中产生大量氧自由基,线粒体发生脂质过氧化反应使线粒体受损。线粒体富含脂质,也是超氧自由基形成的场所,极易发生线粒体功能障碍。多柔比星可致线粒体渗透性改变(mitochondrial permeability transition, MPT)、自稳平衡破坏、肿大及功能紊乱。线粒体过度膨大最终引起线粒体膜破裂,细胞色素 C(CytC)等内容物释放至胞质^[45,46]。Wang 等^[47]利用免疫印迹法研究发现,心肌细胞经多柔比星处理后,线粒体内 CytC 浓度显著降低,而胞质中 CytC 浓度显著升高,提示 CytC 由线粒体释放至胞质。CytC 释放至胞质是心肌细胞凋亡的重要开始。CytC 能聚集凋亡激活蛋白酶因子-1(氧化应激状态下线粒体释放的另一因子)、凋亡 pro-caspase-9 和脱氧三磷酸腺苷(dATP),迅速活化 caspase-3,从而激活心肌细胞凋亡。Coomaghtigh 等^[48]发现,多柔比星与线粒体膜上的心脂形成复合物,造成线粒体损伤,使得 NADH 脱氢酶、CytC 氧化酶(cytochrome C oxygenase, CCO)及琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)的活性降低,使其氧化呼吸链受抑制,导致 ATP 的生成障碍。Calderone 等^[49]发现多柔比星抑制心肌的腺苷酸环化酶的活性,使心肌细胞内环

磷酸腺苷水平降低,也在多柔比星致心肌收缩力减弱中起一定作用。

线粒体 DNA(mtDNA)是裸露的,无组蛋白保护;其代谢转换率高;催化 mtDNA 复制 DNA 聚合酶不具有校读作用,致使错误率高;与核 DNA 相比 mtDNA 缺乏修复机制,因此,mtDNA 更易受到自由基攻击而损伤,损伤后又不易被修复而积累。研究表明,慢性多柔比星心肌病时 mtDNA 缺失和突变呈时间依赖性以及心脏特异性积累^[50]。Chaiswing 等^[51]研究发现,在发生多柔比星心肌病时,线粒体被损害过程中发生了氧化损伤和硝基化损伤,且线粒体是这一过程中主要受损的亚细胞器。

6 核酸、蛋白质合成的抑制

Sazuka 等^[52]发现多柔比星抑制心肌细胞的 DNA、RNA 及蛋白质的合成,并且这种抑制作用与具有抗脂质过氧化的酶(如 GSH-Px)的活性降低密切相关,提示多柔比星引起的脂质过氧化反应增强参与这种抑制作用。Akimoto 等^[53]研究表明多柔比星诱导心肌特异性 α -actin 表达明显降低,体外细胞实验发现多柔比星能插入 DNA 并与 c-myc 基因上游增加子和拓扑异构酶 I 相互作用,影响心肌基因转录水平表达。陈伟等^[54]以 RT-PCR 方法对多柔比星心肌损伤 H^+ -ATPase β -亚基可抑制蛋白基因 mRNA 水平进行定量分析,表明 H^+ -ATPase 催化亚基 mRNA 水平表达量降低,从基因水平影响心脏能量代谢,可能是多柔比星心肌病的重要发病机制之一。

7 细胞凋亡

细胞凋亡是英国病理学者 Kerr 等于 1972 年发现的一种特殊的细胞死亡过程,又称为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),是细胞对环境的生理病理性刺激信号,环境条件的变化或缓慢性损伤产生的有序变化的死亡过程。细胞凋亡是机体在生长、发育和受外界刺激时,清除多余、衰老和受损伤的细胞以保持机体内环境平衡的一种自我调节机制,过度的凋亡或正常的凋亡过程被抑制,均可导致机体发生病理改变甚至死亡。细胞凋亡的发生是由于内、外环境的变化或死亡信号的触发,在基因调控下所发生的一系列细胞主动死亡过程^[55]。在多柔比星心肌病发病过程中,细胞凋亡发挥极其重要的作用,在光镜下可见多柔比星处理过的心肌组织中存在大量凋亡的细胞。研究发现,心肌细胞和内皮细胞即使暴露在低于微摩尔浓度的多柔比星中也会发生细胞凋亡^[56]。

7.1 Fas 蛋白/Fas 配体信号系统 Fas 蛋白是细胞膜上的跨膜蛋白,属于受体家族。Fas 通过 Fas 配体(FasL)作用诱导细胞凋亡,且许多动物实验研究证实 Fas 可以在各种受损心肌中过度表达^[57]。Nakamura 等^[58]在多柔比星心肌病大鼠模型中研究证实,细胞凋亡由 Fas 途径介导,抗 FasL

抗体能抑制多柔比星诱导的细胞凋亡进而改善心功能。而 Wu 等^[59]对多柔比星心肌病大鼠体内、外实验中发现使用广谱 caspases 抑制剂,能抑制多柔比星引起的内皮细胞凋亡,而抗 FasL 抗体并不能抑制内皮细胞凋亡,因此认为多柔比星诱导的心肌细胞与内皮细胞凋亡是通过不同的途径介导的,Fas/FasL 信号转导途径与多柔比星诱导的内皮细胞凋亡无关。

7.2 神经酰胺信号系统 神经酰胺 (ceramide) 是神经鞘磷脂在神经鞘磷脂酶作用下产生的一类新型第二信使。目前认为,神经酰胺促凋亡主要有 3 种途径:①直接激活 caspases,导致 caspase-3 激活,活化内切酶,并使 DNA 片段化程度加重;②激活 SAPK/JNK 途径,改变 Rb、c-myc 等关键蛋白的功能或表达,引起 caspase-3 依赖的凋亡程序启动;③激活核因子 κ B (NF- κ B) 诱导细胞凋亡。Delpy 等^[60]用多柔比星处理的大鼠心室肌细胞研究发现,凋亡细胞内神经酰胺显著增加,说明多柔比星可以通过神经酰胺诱导细胞凋亡。

7.3 PI3-K/Akt 信号转导途径 磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)/蛋白激酶 (Akt) 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有多种调节功能,能使磷脂酰肌醇分子中的 3 位羟基磷酸化,活化 PI3-K 的产物能激活蛋白激酶 PDK,后者再激活 Akt/蛋白激酶 B (PKB),抑制细胞凋亡的发生。Akt 对心肌细胞的生长、摄取葡萄糖和死亡等生命活动具有重要的调控作用。氧化应激状态下,Akt 对心肌细胞具有重要的保护作用^[61]。Akt 能通过抑制 Bad 等促凋亡分子 (pro-apoptotic molecules) 活性,同时激活 FLIP (FasL 抑制蛋白) 和 IKK α 等促生存分子 (pro-survival molecules) 活性,发挥抗细胞凋亡作用。PI3-K/Akt 信号转导通路在细胞凋亡调控中发挥重要作用。多柔比星能显著抑制心肌细胞中的 Akt 信号转导,这一效应与其心脏毒性有着密切联系。

应用血管紧张素-I、糖蛋白 130 及胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 等激活 Akt 信号通路可显著降低多柔比星所致的心肌细胞凋亡^[62~65]。研究表明,在非心肌细胞中,IGF-1 可通过活化多条信号途径以拮抗多柔比星的细胞毒性作用;而在心肌细胞中,IGF-1 则仅能通过活化 Akt 信号途径以降低多柔比星的心肌细胞毒性^[64]。由此推断,Akt 信号途径可能在多柔比星介导心脏毒性过程中具有某种特异性作用。多柔比星可明显上调 Fas 及 FasL 的表达,其心脏毒性与 Fas 死亡受体介导的细胞凋亡有密切关系。抑制 Akt 信号途径可通过 caspase 及 Jun 激酶依赖性机制诱导 FasL 表达,促进 FasL 介导的细胞凋亡。反之,活化 Akt 信号途径则能促进 FLIP 的表达,同时抑制多柔比星诱导的 p53 上调^[62,66]。

此外, Akt 可通过蛋白磷酸化调控 caspase-9 活性,从而进一步调节 caspase-3 介导的细胞凋亡^[67]。Negoro 等^[63]

报道 Akt 能明显抑制多柔比星诱导的 caspase-9 及 caspase-3 的活化,提高心肌细胞的存活率,提示 Akt 信号与多柔比星诱发的 caspase 活化有着密切关系。Wu 等^[68]用多柔比星处理转染活化的 PI3-K 心肌细胞,在该心肌细胞中发现活化的 PI3-K 能磷酸化 Akt,并进一步抑制 caspase-3 活化,减轻细胞凋亡。另外, IGF-1 在心肌病动物模型中能抑制心肌细胞凋亡,改善心功能。Lai 等^[69]发现多柔比星处理心肌细胞后,迅速引起线粒体电化学梯度的下降,引发线粒体去极化,而 IGF-1 通过 PI3-K/Akt 途径恢复线粒体电化学梯度,但 PI3-K 抑制剂能阻断 IGF-1 的这种作用,说明 PI3-K/Akt 可以通过 IGF-1 起到心肌保护作用。这也表明多柔比星可影响 PI3-K/Akt 途径,从而引起细胞凋亡的发生。

7.4 p38 MAPK 途径 MAPK 家族是一组调控细胞生长、凋亡等生命活动的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。p38 MAPK 是 MAPKs 超家族中的亚家族,在心肌细胞凋亡研究中最广泛,包括 p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ 4 种亚型。p38 MAPK 途径是 MAPKs 超家族中的重要组成部分,激活后能激活转录因子,调节特定的基因表达。p38 MAPK 对外源性化合物的氧化应激具有很高的敏感性,其活化与氧化应激状态下 ROS 浓度蓄积有关^[70]。已有研究表明, p38 MAPK 与心肌细胞凋亡的开始有密切关系,其活化可能在心肌细胞凋亡过程发挥着关键作用^[71,72]。多柔比星能迅速活化 p38 MAPK,诱导心肌细胞凋亡。在多柔比星所致的心功能衰竭动物模型中,可见 p38 MAPK 的表达明显上调^[73]。多柔比星处理后约 20 min, p38 MAPK 便已活化,此后 10 min (即多柔比星给药处理后约 30 min) 心肌细胞凋亡开始^[74]。p38 MAPK 的活化先于细胞凋亡,提示 p38 MAPK 的活化可能是细胞凋亡的重要开始。Lou 等^[75]对多柔比星心肌病模型大鼠的研究发现, p38 和 JNK (c-Jun NH₂-terminal kinases) MAPKs 的持续性增加会诱导多柔比星心肌病细胞的凋亡和心力衰竭的发生。p38 MAPK 途径参与细胞凋亡的机制与以下几点有关:增强 c-myc 的表达;使 p53 的丝氨酸发生磷酸化,从而诱导细胞凋亡;参与 Fas/FasL 介导的细胞凋亡^[71]。

Kang 等^[74]研究表明,金属硫蛋白 (MT) 可明显抑制多柔比星所致的心肌细胞凋亡及 p38 MAPK 的活化,这种效应在体内、外研究中均得到证实。尽管 MT 仅部分地抑制心肌细胞凋亡 (抑制率 50%), 但 p38 MAPK 的活化几乎完全被阻断。p38 MAPK 抑制剂 SB203580 对 p38 α 和 p38 β 有特异性抑制作用,对 p38 γ 和 p38 δ 没有抑制作用。SB203580 能显著抑制多柔比星诱导的心肌细胞凋亡,提示 p38 α 和 p38 β 在此过程中可能发挥重要作用。Wang 等^[71]研究报道, p38 α 能特异性参与新生大鼠心肌细胞的凋亡, p38 β 主要作用为介导心肌细胞肥大。

7.5 线粒体途径 死亡信号到达线粒体后,线粒体内膜的跨膜电位下降,线粒体内、外膜之间的通透性转换孔开放,

线粒体膜通透性增大,使线粒体膜间腔的 CytC 释放入胞质,与凋亡激活因子-1 (apoptosis activating factor-1, Apaf-1) 及 pro-caspase-9 形成凋亡小体 (apoptosome), 在 ATP 参与下, 凋亡小体内的 pro-caspase-9 可自身激活, 激活细胞凋亡途径。Childs 等^[46] 研究证实, 心肌细胞经多柔比星处理后, 细胞凋亡显著增加, 且心肌细胞内 CytC 增加 2 倍, 并与 caspase-3 增加量明显相关。Spallarossa 等^[76] 研究发现, 肾上腺素抑制剂卡维地洛 (carvedilol) 能显著降低多柔比星处理后培养的 H9C2 心肌细胞中 caspase-3 的增加, 从而保护心肌细胞。Heon 等^[77] 研究表明, 心脏保护剂右雷佐生 (dexrazoxane) 不能降低多柔比星引起的幼鼠心肌细胞 caspase-3 增加, 并不能保护多柔比星对幼鼠引起的心脏损害。

以上研究均说明, 多柔比星引起线粒体的变化, 最终通过 caspase-3 引起心肌细胞凋亡发生。同时, Lien 等^[78] 研究发现, 对于 TNF 受体失活的小鼠, 在多柔比星的毒性作用下, 心肌细胞中线粒体损害明显, 且发生细胞凋亡, 进一步的实验证明, TNF- α 受体 I 和 II 可以通过阻止线粒体内 CytC 的释放及 caspase-3 的激活, 并且抑制 Fas 途径引起的细胞凋亡, 阻止活性氧的生成, 避免心磷脂和线粒体的呼吸功能受到干扰, 从而对多柔比星心肌病中线粒体损伤引起的细胞凋亡起到保护作用。

7.6 p35 途径 p35 是在杆状病毒基因组中发现的细胞凋亡抑制基因, 其通过抑制 caspase 的活性而抑制细胞凋亡。在体内 P35 蛋白通过阻断 caspase 大亚基的断裂抑制其成熟, 从而阻断该酶的活化, 抑制细胞凋亡的发生。Date 等^[79] 在多柔比星处理后的乳鼠心肌细胞中发现, 转导表达 P35 的重组腺病毒载体的心肌细胞能显著降低多柔比星引起的 ROS 增加, 抑制线粒体释放 CytC, 抑制 caspase-8 和 caspase-3 活性, 从而显著降低心肌细胞的凋亡, 说明 p35 途径在多柔比星心肌病中起到保护作用。

7.7 Bcl-2 家族 Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-x) 家族按功能又可分为抑制和促进凋亡的两个亚家族。抑制凋亡的 Bcl-2 亚家族主要包括 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bcl-w 等。Bcl-2 抑制凋亡的机制是直接或间接抑制 CytC 自线粒体的释放, 而后者可与 ATP 一起改变 Apaf-1 的构型使 caspase-9 激活。Amstad 等^[80] 研究发现, Bcl-2 过度表达的转基因小鼠, 对于自由基损伤的抵抗能力明显增强, 而且使抗氧化酶类的活性不受影响, 因此 Bcl-2 在一定程度上通过减轻细胞的氧化应激损伤从而抑制细胞凋亡。Wu 等^[59] 在多柔比星处理培养的乳鼠心肌细胞和脐静脉内皮细胞中发现, 细胞内 Bcl-2 表达下降, 且与多柔比星的剂量相关。Kitta 等^[81] 发现多柔比星能够通过促进 Bcl-xl 表达下调引起心肌细胞凋亡。Shan 等^[82] 发现热休克蛋白 (Hsp) 10 或 Hsp 60 可增加心肌细胞内的 Bcl-xl 和 Bcl-2 表达, 从而抑制多柔比星引起的心肌细胞凋亡。Spallarossa 等^[76] 则发现多柔比星引起

的 H9C2 心肌细胞中 Bcl-2 的降低可通过卡维地洛显著改善。而右雷佐生不能提高多柔比星所致的幼鼠心肌细胞 Bcl-2 的降低, 因此不能改善多柔比星对幼鼠引起的心脏损害^[76]。促进凋亡的 Bax 亚族包括 Bax、Bak 和 Bad 等。它们的过度表达能诱发细胞凋亡。Bax 能与 Bcl-2 形成异源二聚体通过抑制后者活性, 使凋亡易于发生。

Shan 等^[82] 认为 Hsp 10 或 Hsp 60 在心肌细胞内过度表达, 降低心肌细胞内的促凋亡蛋白 Bax 含量, Hsp 60 过度表达还能显著降低 Bad 蛋白含量, 均能降低多柔比星引起的心肌细胞凋亡。Wu 等^[59] 同样发现多柔比星可引起细胞内 Bax 增加。卡维地洛能显著降低多柔比星引起的 Bax- α mRNA 的增加而具有心肌细胞保护作用^[76]。右雷佐生并不能降低多柔比星引起的幼鼠心肌细胞 Bax 的增加, 对多柔比星致幼鼠心脏损害无保护作用^[77]。

7.8 p53 途径 野生型 p53 基因具有诱导细胞凋亡的功能, 当该基因发生突变后反而可抑制细胞凋亡。野生型 p53 基因编码的 P53 蛋白是一种 DNA 结合蛋白, 该蛋白在细胞周期的 G₁ 期发挥检查点的功能, 负责检查染色体 DNA 是否有损伤, 一旦发现有缺陷的 DNA, 就阻止细胞进入细胞周期, 并启动 DNA 修复机制; 如果修复失败, p53 则启动细胞凋亡机制。Liu 等^[83] 发现多柔比星处理后大鼠心肌细胞中 P53 蛋白增加, 心肌细胞凋亡增加。pifithrin- α (PFT- α) 是 p53 抑制剂, 能有效地抑制多柔比星引起的心肌细胞凋亡。吴伟康等^[84] 用多柔比星复制大鼠慢性心力衰竭模型, 发现心力衰竭时心肌组织的 P53 蛋白明显增加, 心肌细胞 p53 mRNA 的表达亦明显增加, 提示了 p53 基因表达增多可能是导致 P53 蛋白合成增加, 心肌细胞凋亡增加, 心力衰竭形成的重要途径。

Wang 等^[85] 发现, 经多柔比星处理后, 正常的牛主动脉内皮细胞中, caspase-3 的活化要早于 p53 转录的激活; 而在肿瘤细胞中 p53 转录激活要早于 caspase-3 活化。这表明 p53 转录的激活对多柔比星引起的肿瘤细胞凋亡较多柔比星引起的内皮细胞凋亡发挥更关键的作用。PFT- α 在肿瘤细胞中能完全抑制 p53 活化, 并能抑制肿瘤细胞的凋亡, 相反在心肌细胞和内皮细胞中尽管能抑制 p53 活化, 但并不能抑制其凋亡。而 H₂O₂ 的灭活剂金属卟啉和 GSH-Px 能减轻多柔比星引起的心肌细胞和内皮细胞凋亡, 对肿瘤细胞则无作用, 可见, 多柔比星引起正常细胞和肿瘤细胞凋亡的作用机制是不同的。但 Nakamura 等^[88] 对多柔比星心肌病大鼠的研究发现, 多柔比星组大鼠心肌中 p53 基因的表达与对照组差异无统计学意义, 而 Fas 抗原却有过度的表达, 考虑 Fas 途径在诱导多柔比星心肌病细胞凋亡中作用更重要。

7.9 GATA-4 途径 转录因子 GATA-4 是抗凋亡基因 Bcl-X 上游的活化因子。Kim 等^[86] 发现多柔比星能抑制转录因子 GATA-4 的表达, 抗凋亡基因 Bcl-X 不能活化, 从而不

能发挥抗细胞凋亡的作用,且 GATA-4 的抑制与多柔比星引起的细胞凋亡有关。Aries 等^[87]发现接种无效等位基因 GATA-4 的杂合子鼠易于发生多柔比星心肌病,通过基因或药物增强 GATA-4 功能则能抑制心肌细胞凋亡,抑制多柔比星诱导的心肌病。

7.10 TNF- α 心肌细胞是 TNF- α 的来源,同时也是 TNF- α 作用的靶点。在体内、外研究表明, TNF- α 在心肌细胞的死亡过程中具有重要作用^[88]。在多柔比星所致的心力衰竭疾病中, TNF- α 的表达水平明显升高,其最显著的作用是诱导心肌细胞的凋亡^[89,90]。TNF- α 可通过 TNF 受体 (TNFR)-1 和 TNFR-2 介导心肌细胞的凋亡。TNFR 的活化可进一步激活 caspase-8,继而切断 BID(一段包含凋亡激活蛋白酶原 Bcl-2 家族成员的结构域)。断裂的 BID 片段由胞质进入线粒体,引起线粒体聚集至细胞核周围并释放 CytC,线粒体膜电位丧失,细胞核乃至整个细胞皱缩,最终导致细胞凋亡。活化的 caspase-8 还可直接活化 caspase-3 介导心肌细胞凋亡^[91]。Mukherjee 等^[92]及 Mohamed 等^[93]研究发现,在多柔比星给药前应用大蒜匀浆和 TNF- α 特异性抑制剂咯利普兰 (rolipram) 预处理动物,可明显抑制 TNF- α 的过度表达,使多柔比星心脏毒性作用显著降低,而且咯利普兰对心肌的保护作用优于自由基清除剂牛磺酸。

8 NO

20 世纪 80 年代后期,气体信号分子 NO 首先被发现可内源性产生^[94,95],并陆续发现其广泛参与了机体呼吸、心血管、神经和免疫系统的生理及病理调节而被认为是重要的、调节生命活动的内源性气体信号分子。1992 年,NO 被美国《科学》杂志命名为“明星分子”(the molecule of the year)^[96]。此后,气体信号分子作为一个全新的概念出现在生命科学研究的各个领域,并为科学研究提供了新的思路。作为简单的无机小分子,推测气体分子因为其能穿透受体、酶和通道,有可能构成血管细胞间相互调节的一种快速、安全的生物学通路,从而实现其复杂的生物学和病理生理学功能,因此有关气体信号分子的研究必将越来越引起人们的关注。NO 是体内细胞产生的一种具有生物活性的简单无机分子,在细胞间的信息传递、细胞防御和细胞损伤方面具有重要的作用;但当机体处于某些特殊情况下刺激其产生过量时,对细胞则有毒性效应。Moncada 等^[97]发现哺乳动物细胞内可合成内源性 NO。细胞质中的 NOS L-精氨酸和分子氧作为底物,以还原型 NADPH 作为辅助因子提供电子,并且由 FAD-FMN-四氢蝶呤传递电子,催化氧化 L-精氨酸的胍基氮,最终形成 NO \cdot 和 L-瓜氨酸 (L-citrulline)^[98]。NO \cdot 行使何种作用与其生成细胞所含的 NOS 类型密切相关,NOS 作为 NO \cdot 生成关键的唯一限速酶,对其生物学功能的发挥起着非常重要的作用。

NOS 有两种类型:一种是依赖于 Ca²⁺ 和钙调蛋白的

结构型 NOS (cNOS),另一种则是不依赖于 Ca²⁺ 和钙调蛋白的 iNOS^[99];目前已明确 NOS 至少有 3 种同工酶:脑细胞型 NOS (bNOS)、巨噬细胞型 NOS (mNOS) 及内皮细胞型 NOS (eNOS),均已克隆成功,是不同基因的产物。bNOS 和 eNOS 属 cNOS,主要存在于血管内皮、平滑肌和神经等细胞中,各种刺激致细胞内 Ca²⁺ 浓度升高可激活 cNOS,于数秒钟内少量间歇释放 NO,传递细胞信息,发挥正常的生理调节作用,如控制血管紧张度、调节血小板聚集以及作为神经递质等^[100]。这类 NO \cdot 通过活化可溶性鸟苷酸环化酶 (GC),导致 cGMP 升高,随后调节蛋白激酶、磷酸二酯酶的活力和引起离子通道等一系列变化。mNOS 属 iNOS,不依赖 Ca²⁺,正常情况下不出现在健康细胞内,在机体病理情况下可被内毒素(如 LPS)、卡介苗、外毒素(如毒性休克综合征毒素-1)或细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-1 β 等激活,从而诱导产生持续时间长且大量的 NO \cdot ^[97]。iNOS 产生的 NO \cdot 对细胞主要发挥细胞毒性作用,通过 NO \cdot 作用于靶细胞的胞质和胞核中许多 NO \cdot 的靶分子而发挥作用。

近年,陈立娟等^[101]对多柔比星心肌病大鼠的研究发现,NO 能与过氧化物反应产生 ONOO⁻,ONOO⁻ 可迅速分解为高活性的 \cdot OH 和 NO \cdot 等自由基而参与脂质过氧化反应,发挥其毒性作用。刘宝刚^[102]对多柔比星心肌病大鼠心肌组织中 NO 水平及 iNOS 的活性测定发现,两者均明显增加,而 iNOS mRNA 的表达亦明显增加,细胞凋亡指数增加,说明在多柔比星心肌病发病过程中 iNOS 可通过增加细胞凋亡引起心肌损害。Liu 等^[103]对多柔比星心肌病大鼠研究发现,其心肌组织中 iNOS 含量明显增加,而 nNOS 和 eNOS 的含量没有明显变化,说明多柔比星是通过 iNOS 诱导 NO 大量产生而导致心肌损伤。陈河等^[104]研究发现,多柔比星能使实验兔心肌组织中 NOS 表达上调,表明多柔比星可刺激心肌产生 iNOS 并持续合成 NO,使其浓度超过正常生理量。考虑多柔比星所致炎症过程中所产生的炎症介质和内毒素可能是刺激心肌产生 iNOS 合成 NO 的原因。过量的 NO 能介导抑制细胞生长和细胞毒性作用,造成细胞或组织的损伤^[105]。NO 的细胞毒性作用,可能是由于细胞内 O₂⁻ 与 NO 作用形成过亚硝化合物,引起组织损伤;也可能是由于 NO 介导的酶内铁硫中心(iron-sulfur center)的破坏所引起,致使线粒体功能损伤,DNA 合成障碍^[106]。

刘宝刚等^[107]发现,外源性给予 NOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯,可以通过抑制 NOS 活性,使心肌组织 NO 生成减少,从而对多柔比星心肌病大鼠的心肌组织发挥保护作用。目前认为,NO 具有典型的“双重性”,内皮源性 NO 是一种抗氧化剂^[108],具有抑制炎症反应的作用,而病理情况下 iNOS 合成大量的 NO,则有细胞毒性作用,加重炎症反应^[109]。赵建美等^[110]对多柔比星心肌病大鼠研究发现,多柔比星可使大鼠产生 NO 和促进氧自由基的释放,导致心肌病的发生,而给予大鼠 L-Arg,促进内皮源性 NO 的合成,

反馈抑制具有细胞毒性的 iNOS, 发挥其抗氧自由基作用, 使冠状动脉扩张, 增加冠脉流量, 可起到心肌保护作用。

综上所述, 多柔比星通过多种途径导致了心脏病的发生, 这些途径相互关联, 既有协同也有拮抗作用, 最终导致多柔比星心肌病及充血性心力衰竭的发生甚至造成死亡。尽管目前尚无有效的预防手段, 但随着细胞、基因及气体信号分子研究的不断深入, 对多柔比星心脏病的发病机制了解不断增加, 必将能寻出更有效的监控手段, 并为临床上更有效地防治多柔比星心肌病提供理论依据。

参考文献

- [1] Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC-123, 127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother*, 1969, 53(1):33-37
- [2] Arcamone F, Cassineli G, Fantini G, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioengin*, 1969, 11(6): 1101-1110
- [3] Bonadonna G., Monfardini S, De Lena M, et al. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Res*, 1970, 30(10):2572-2582
- [4] Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, et al. A Clinopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 1973, 32(2): 302-314
- [5] Unverferth DV, Magorien RD, Leier CV, et al. Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev*, 1982, 9(2):149-164
- [6] Haq MM, Legha SS, Choksi J, et al. Doxorubicin-induced congestive heart failure in adults. *Cancer*, 1985, 56(6):1361-1365
- [7] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5):330-352
- [8] Biskup P, Wozakowska-Kaplon B, Gozdz S. Anthracycline induced cardiomyopathy in 51-years old women with breast cancer. *Pol Arch Med Wewn*, 2006, 115(6):551-558
- [9] Quiles JL, Huertas JR, Battino M, et al. Antioxidant nutrient sand adriamycin toxicity. *Toxicology*, 2002, 180(1):79-95
- [10] Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, et al. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*, 1990, 47(2): 219-231
- [11] Guo JB (郭家彬), Sheng ZG, Peng SQ. Signal pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2006, 20(2):157-160
- [12] Singal PK, Iliskovic N, Li T, et al. Heart failure due to doxorubicin. *Kuwait Med J*, 2001, 33(2):111-115
- [13] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123(10): 855-866
- [14] Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy. *Pharmacol Toxicol*, 2003, 93(3):105-115
- [15] Nohl H. Identification of the site of adriamycin activation in the heart cell. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(13):2633-2637
- [16] Myers C. The role of iron in doxorubicin induced cardiomyopathy. *Semin Oncol*, 1998, 25(4 S10):10-14
- [17] Weinstein DM, Mikm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294(1):396-401
- [18] Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, et al. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experiment autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*, 1997, 95(2): 489-496
- [19] Li YM (李咏梅), Ning BG, Zhao GF, et al. Study of molecular mechanism of cardiac injury induced by adriamycin. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics (中国临床药理学与治疗学)*, 2002, 7(3):209-212
- [20] Meyers CE, McGuire WP, Liss RH, et al. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 1977, 197(4299):165-167
- [21] Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J*, 2004, 18(6):664-675
- [22] Kwok JC, Richardson DR. Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(4):849-861
- [23] Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defense of the mouse heart against reactive oxygen metabolites : alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest*, 1980, 65(1):128-135
- [24] Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*, 2000, 102(17):2105-2110
- [25] Chen Y, Daosukho C, Opii WO, et al. Redox proteomic identification of oxidized cardiac proteins in adriamycin-treated mice. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(9):1470-1477
- [26] Munoz-Castaneda JR, Muntane J, Herencia C, et al. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecol Endocrinol*, 2006, 22(2):74-79
- [27] Lou H, Kaur K, Shama AK, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes. *Pathophysiology*, 2006, 13(2): 103-109
- [28] Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, et al. Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(4):831-836

- [29] Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4): 1925-1930
- [30] Kwok JC, Richardson DR. Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(1):181-195
- [31] Minotti G, Ronchi R, Salvatorelli E, et al. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res*, 2001, 61(23):8422-8428
- [32] Kim DH, Landry AB, Lee YS, et al. Doxorubicin-induced calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 21(5): 433-436
- [33] Wallace KB. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol*, 2007, 7(2):101-107
- [34] Ondrias K, Bo rgata L, Kim DH, et al. Biphasic effects of doxorubicin on the calcium release channel from sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. *Circ Res*, 1990, 67(5): 1167-1174
- [35] Jaenke RS. Delayed and progressive myocardial lesions after adriamycin administration in the rabbit. *Cancer Res*, 1976, 36(8):2958-2966
- [36] Maeda A, Honda M, Kuramochi T, et al. Doxorubicin cardiotoxicity: diastolic cardiac myocyte dysfunction as a result of impaired calcium handling in isolated cardiac myocytes. *Jpn Circ J*, 1998, 62(7):505-511
- [37] Huang XM, Zhu WH, Kang ML. Study on the effect of doxorubicin on expression of genes encoding myocardial sarcoplasmic reticulum transport proteins and the effect of taurine on myocardial protection in rabbits. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003, 4(1):114-120
- [38] Huang XM(黄先玫), Kang ML, Du LZ. Effect of adriamycin on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in cardiomyocyte of rabbits. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences(浙江大学学报医学版)*, 2002, 31(1):38-40
- [39] Santos DL, Moreno AJ, Leine RL, et al. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 185(3):218-227
- [40] Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 356(1):1-11
- [41] Yang GM(阳冠明), Li SQ, Ye SY, et al. Effects of fructose-1, 6-diphosphate on adriamycin induce myocardial tyrosine nitration in rats. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2002, 18(2):161-164
- [42] Pacher P, Liauded L, Bai P, et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protect against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*, 2003, 107(6):896-904
- [43] Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1588(1):94-101
- [44] Zhou S, Starkov A, Froberg MK, et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res*, 2001(61):771-777
- [45] Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, et al. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33585-33592
- [46] Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res*, 2002, 62(16):4592-4598
- [47] Wang GW, Zhou ZX, Kang YJ. Effect of metallothionein on doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes: role of cytochrome C-activated caspase-3. *Toxicologist*, 2000, 54(Abstract Issue):114
- [48] Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, et al. Structure of the adriamycin -cardiolipin complex: role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem*, 1990, 35(2-3): 247-257
- [49] Calderone A, Dechamplain J, Rouleau JL. Adriamycin induced changes to the myocardial beta-adrenergic system in the rabbit. *J Med Cell Cardiol*, 1994, 23(3): 333-342
- [50] Lebrecht D, Walker UA. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*, 2007, 7(2): 108-113
- [51] Chaiswing L, Cole MP, St Clair DK, et al. Oxidative damage precedes nitrate damage in adriamycin-induced cardiac mitochondrial injury. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(5):536-547
- [52] Sazika Y, Tanizawa H, Takino Y. Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein biosynthesis in mouse tissues, in connection with its cardiotoxicity. *Jpn J Cancer Res*, 1989, 80(10):1000-1005
- [53] Akimoto H, Bruno NA, Slate DL, et al. Effect of verapamil on doxorubicin cardiotoxicity: altered muscle gene expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Cancer Res*, 1993, 53(19):4658-4664
- [54] Chen W(陈伟), Zhu SJ, Liu LZ, et al. Analysis of expression of H⁺-ATPase β -subunit and inhibitor protein in rats with adriamycin-induced cardiomyopathy. *Chinese Journal of Endemiology(中国地方病学杂志)*, 2001, 20(4):265-267

- [55]Wu H(吴红). 细胞凋亡的信号传导及其基因表达调控作用研究. *Practical Clinical Medicine(实用临床医学)*,2006,7(4):143-145
- [56]Kalyanaram B, Joseph J, Kalvendi S, et al . Doxorubicin - induced apoptosis: implication in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234-235(1-2):119-124
- [57]Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, 74(1):86-107
- [58]Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, et al. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats in vivo study. *Circulation*, 2000, 102(5): 572-578
- [59]Wu S, Ko YS, Teng MS, et al. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(12):1595-1607
- [60]Delpy E, Hatem SN, Andrieu N, et al. Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 1999, 43(2):398-407
- [61]Aikawa R, Nawano M, Gu Y, et al. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*, 2000, 102(23): 2873-2879
- [62]Yin D, Li C, Kao RL, et al. Angiotensin-1 inhibits doxorubicin-induced human umbilical vein endothelial cell death by modulating fas expression and via the PI3K/Akt pathway. *Endothelium*, 2004, 11(5-6):247-252
- [63]Negoro S, Oh H, Tone E, et al. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation*, 2001, 103(4):555-561
- [64]Chae HJ, Kim HR, Bae J, et al. Signal transduction of the protective effect of insulin like growth factor-I on adriamycin-induced apoptosis in cardiac muscle cells. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(3):324-333
- [65]Taniyama Y, Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(10): 1241-1247
- [66]Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*, 2000, 101(6):660-667
- [67]Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 1997, 278(5338):687-689
- [68]Wu W, Lee WL, Wu YY, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase-3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40113-40119
- [69]Lai HC, Liu TJ, Ting CT, et al. Insulin like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI-kinase /Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 205(122):99-106
- [70]Chen QM, Tu VC, Purdon S, et al. Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy induced by toxicants. *Cardiovasc Toxicol*, 2001, 1(4):267-283
- [71]Wang Y, Huang S, Sah VP, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*, 1998, 273(4):2161-2168
- [72]Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, et al. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem*, 1997, 272(32):19943-19950
- [73]Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz*, 2002, 27(7):662-668
- [74]Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, et al. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13690-13698
- [75]Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4): 1925-1930
- [76]Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37(4):837-846
- [77]Heon S, Bernier M, Servant N, et al. Dexrazoxane does not protect against doxorubicin-induced damage in young rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2):499-506
- [78]Lien YC, Lin SM, Nithipongvanich R, et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency exacerbated Adriamycin-induced cardiomyocytes apoptosis: an insight into the Fas connection. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(2):261-269
- [79]Date T, Luo Z, Yamakawa M, et al. Myocardial expression of baculoviral p35 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(10):947-957
- [80]Amstad PA, Liu H, Ichimiya M, et al. BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep*, 2001, 6(6):351-362
- [81]Kitta K, Day RM, Kim Y, et al. Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 4705-4712
- [82]Shan YX, Liu TJ, Su HF, et al. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(9):1135-1143

- [83]Liu X, Chua CC, Gao J, et al. Pifilrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286 (3): 933-939
- [84]Wu WK(吴伟康), Yang H, Zhao MQ. Mechanisms of heart failure induced by adriamycin. *Chinese Journal of Pathophysiology(中国病理生理杂志)*, 2004, 20(8): 1437-1439
- [85]Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, et al. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H2O2- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*, 2004, 279(24):25535-25543
- [86]Kim Y, Ma AG, Kita K, et al. Anthracycline induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(2): 368-377
- [87]Aries A, Paradis P, Lefebvre C, et al. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18):6975-6983
- [88]Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res*, 1999, 40(2):97-105
- [89]Rossi F, Filippelli W, Russo S, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin: effects of drugs inhibiting the release of vasoactive substances. *Pharmacol Toxicol*, 1994, 75(2):99-107
- [90]Kubota T, Miyagishima M, Alvarez M. Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent onset and end-stage congestive heart failure. *Heart Lung Transplant*, 2000, 19(9): 819-824
- [91]Li H, Zhu H, Xu CJ, et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94(4):491-501
- [92]Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, et al. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. *BMC Pharmacol*, 2003, 20:3(1):1-16
- [93]Mohamed HE, Asker ME, Ali SI, et al. Protection against doxorubicin cardiomyopathy in rats: role of phosphodiesterase inhibitors type 4. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(6):757-768
- [94]Gao YQ(刘彦波), Li ZL, Wu HC, et al. Changes of plasma adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide concentrations in patients with heart failure. *Journal of First Military Medical University(第一军医大学学报)*, 2002, 22(7):632-634
- [95]Fisher LA, Kikkawa DO, Rivier JE, et al. Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1983, 305(5934):534-536
- [96]Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science*, 1992, 258(5090):1861
- [97]Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2):109-142
- [98]Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 1992, 70(5):705-707
- [99]Shao Y(邵源), Sun CP, Qiang YZ. NO·的细胞毒性作用. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational (中华劳动卫生职业病杂志)*, 1996, 14(5):317-320
- [100]Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, et al. Isoforms of nitric oxide synthase, characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42(10): 1849-1857
- [101]Chen LJ(陈立娟), Guo JB, Peng SQ. Experimental study on adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. *Journal of Health Toxicology(毒理学杂志)*, 2006, 20(3):147-149
- [102]Liu BG(刘宝刚), E MY, Li YJ, et al. Effect of adriamycin on expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in rat myocardium. *Chinese Journal of Endemiology(中国地方病学杂志)*, 2004, 23(3):210-212
- [103]Liu B, Li H, Qu H, et al. Nitric Oxide Synthase Expressions in ADR-induced Cardiomyopathy in Rats. *J Biochem Mole Bio*, 2006, 39(6):759-765
- [104]Chen H(陈河), Huang XM, Zhao WH, et al. The relationship between injury of cardiac muscular tissue caused by adriamycin and the activity of adenosine triphosphatase and expression of nitric oxide synthase in rabbits. *Journal of Hangzhou Medical College(杭州医学高等专科学校学报)*, 2002, 23(1-2):4-6
- [105]Haywood GA, Tsao PS, Legen HE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*, 1996, 93(6):1087-1090
- [106]Bolanos JP, Almeida A, Medina JM, et al. Nitric oxide mediates brain mitochondrial damage during perinatal anoxia. *Brain Res*, 1998, 781(1):117-122
- [107]Liu BG(刘宝刚), Zhou LW, Yu WH. Effect of NG-nitro-L-argininemethyl-ester on rat myocardial injury induced by adriamycin. *Chinese Journal of Endemiology(中国地方病学杂志)*, 2004, 24(1): 39-41
- [108]Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 289(1):130-136
- [109]Zhang YZ, Xu HZ. 一氧化氮在炎症反应中的作用. *Foreign Medical Science: Anesthesiology & Resuscitation(国外医学麻醉学与复苏分册)*, 1997, 18(1):1-3
- [110]Zhao JM(赵建美), Jiang XT, Xu MY. 一氧化氮在阿霉素心肌病中的病理和生物作用的探讨. *Medical Journal of Communications(交通医学)*, 2000, 14(6):578-579

(收稿日期: 2007-08-25 修回日期: 2007-09-20)

(本文编辑:陈贞华)